

产蛋白酶海洋细菌的筛选及产酶工艺优化

曲均革, 马佳慧, 刘冰雪 (浙江医药高等专科学校制药工程学院, 浙江宁波 315100)

摘要 [目的] 筛选产蛋白酶的海洋细菌资源。[方法] 分别采用 2216E 培养基和酪蛋白固体培养基, 对采自宁波洋沙山和象山海域的海水进行微生物的分离与纯化, 采用平板透明圈法初筛和酶活力测定法复筛, 采用 16S rDNA 序列分析进行菌株鉴定, 并进行产酶工艺优化研究。[结果] 纯化出 15 株产蛋白酶海洋细菌, 从中筛选出 1 株产蛋白酶活力最高的菌株 PB02, 经鉴定为交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas* sp.)。该菌株最适培养温度为 20 ℃, 最适装液量为 10%, 最适接种量为 0.5%, 最适转速为 100 r/min, 最适培养基 pH 为 7。酶促反应最适温度为 40 ℃, 最适 pH 为 10。[结论] 该研究为蛋白酶高产菌株的改造和定向进化奠定了资源基础。

关键词 海洋细菌; 蛋白酶; 筛选; 鉴定; 发酵条件; 酶活性性质

中图分类号 S917; Q938 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)04-0093-04

Screening of Protease-producing Marine Bacterium and Optimization of Its Fermentation Conditions

QU Jun-ge, MA Jia-hui, LIU Bing-xue (Department of Pharmaceutical Engineering, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, Zhejiang 315100)

Abstract [Objective] To screen the protease-producing marine bacterium. [Method] Firstly, 2216E medium and casein solid medium were applied to isolate the protease-producing marine bacteria from Ningbo Yangshashan and Xiangshan Sea. The protease-producing capacity was got by the screening of flat transparent circle method and rescreening of Folin phenol reagent colorimetric method. The strain was identified with the 16S rDNA sequence analysis. [Result] A total of 15 strains of protease-producing marine bacteria were isolated and the strain of PB02 with the highest protease-producing capacity was got. According to the 16S rDNA sequence analysis, the strain belonged to the *Pseudoalteromonas* sp.. The optimum culture temperature 20 ℃, the optimum loading volume 10%, the optimum inoculum size 0.5%, the optimum speed 100 r/min and the optimum medium pH 7 were obtained by the optimization of fermentation conditions. With the research on the properties of protease, the optimum reaction temperature was 40 ℃ and the optimum pH was 10. [Conclusion] The research laid a good foundation for the selection and directed evolution of highly protease-producing strains.

Key words Marine bacterium; Protease; Screening; Identification; Fermentation conditions; Properties of protease

蛋白酶是催化蛋白质水解的一类酶, 可以将蛋白质分解成蛋白胨、多肽以及游离氨基酸, 是目前应用最普遍的酶制剂之一。蛋白酶与人类生活关系密切, 从生物体生理活动到疾病发生等很多方面都受到蛋白酶的影响, 例如食物的消化和吸收、细胞分化和自溶、机体衰老、血液凝固、溶血作用、血压调节、炎症、癌症转移等^[1-2]。目前, 我国已有 20 多种蛋白酶应用于食品、化妆品、洗涤剂、水产、饲料等领域。对近年来国内外对微生物蛋白酶的研究趋势进行分析可知, 新品种开发仍是研究蛋白酶的重中之重^[3-4]。笔者从宁波洋沙山和象山海域采集样品, 最终分离到一株高产蛋白酶的海洋细菌, 对其进行菌种鉴定, 并对其发酵条件和酶学性质进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品。从宁波洋沙山和象山海域采集海水样品。

1.1.2 培养基。

1.1.2.1 富集、活化、发酵培养基。2216E 液体培养基, 具体组成如下: 蛋白胨 5 g/L、酵母膏 1 g/L、磷酸高铁 0.01 g/L, 人工海水定容, pH 7.6~7.8。

1.1.2.2 分离培养基。酪蛋白固体培养基, 具体组成如下: 酪蛋白 4.0 g/L、磷酸二氢钾 0.36 g/L、磷酸氢二钠 1.3 g/L、七水合硫酸锌 0.02 g/L、七水合氯化钙 0.002 g/L、酪蛋白水解物 0.05 g/L、琼脂 18 g/L, 人工海水定容, pH 7.2~7.4^[5]。

1.2 方法

1.2.1 富集培养。分别吸取 1 mL 象山海水和洋沙山海水接入 2216E 液体培养基中, 置于摇床 (150 r/min, 25 ℃) 培养 24 h。

1.2.2 初筛——平板透明圈法。用无菌海水按 10 倍连续梯度稀释法将富集培养后的菌悬液稀释至 10^{-8} , 分别取 0.1 mL 10^{-4} ~ 10^{-8} 稀释液, 涂布接种于酪蛋白固体培养基上。于 25 ℃ 下培养 48 h 后, 挑选透明圈直径与菌落直径比值 (Hc) 较大的菌落, 经平板分区划线分离法纯化后, 在 2216E 斜面上保藏^[6-9]。

1.2.3 复筛——酶活力测定法。

1.2.3.1 粗酶液制备。挑取初筛后有活性的菌株, 将其转接于 2216E 培养基中, 25 ℃、150 r/min 条件下培养 24 h。以 2% 的接种量转接于发酵培养基 (50 mL/250 mL 锥形瓶), 25 ℃、150 r/min 培养 24 h。将发酵液在 10 000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min, 得粗酶液^[10]。

1.2.3.2 蛋白酶活力测定。

(1) 绘制标准曲线。取不同浓度 (20 ~ 100 μg/mL) 酪氨酸溶液各 1 mL, 分别加入 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5 mL、福林酚 1 mL, 置于 40 ℃ 恒温水浴保温显色 20 min, 在 660 nm 处测吸收值。用空白管 (只加水, 碳酸钠溶液和福林酚试剂) 作为对照, 以吸光度值为纵坐标, 以酪氨酸浓度为横坐标, 绘制标准曲线^[10]。

(2) 酶活力测定。在 1 mL 粗酶液中加入 1 mL 2% (W/V) 酪蛋白溶液 (不同 pH 缓冲液配制), 40 ℃ 水浴反应 10 min, 再加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应。将混合液置于 40 ℃ 水浴中继续保温 20 min, 使残余蛋白质沉淀完

基金项目 宁波市自然科学基金项目 (2017A610227)。

作者简介 曲均革 (1977—), 女, 辽宁岫岩人, 副教授, 博士, 从事海洋生物技术研究。

收稿日期 2017-11-22

全后离心,取1 mL上清液加入5 mL 0.4 mol/L的 Na_2CO_3 溶液和1 mL福林酚试剂,将试管振荡均匀后,于40 °C保温发色20 min后,在660 nm处测定OD值,计算蛋白酶活力。同时另做1支空白管,空白管是将粗酶液换成发酵培养基1 mL,其他步骤同上。由上述条件规定,1 mL酶液每分钟水解酪蛋白产生1 μg 酪氨酸为1个酶活力单位(U)^[10]。

1.2.4 菌株发酵条件优化。

1.2.4.1 装液量对菌株产酶活力的影响。在250 mL的三角瓶中分别装入12.5、25.0、50.0、75.0和100.0 mL发酵培养基,150 r/min、25 °C恒温振荡发酵培养24 h,每组3个平行,测定粗酶液酶活力。

1.2.4.2 接种量对菌株产酶活力的影响。分别以0.5%、1.0%、1.5%、2.0%的接种量接入25 mL发酵培养基中,150 r/min、25 °C恒温振荡发酵培养24 h,每组3个平行,测定粗酶液酶活力。

1.2.4.3 培养温度对菌株产酶的影响。分别以15、20、25、30、35 °C为发酵温度进行培养,0.5%的接种量,其他条件维持不变,每组3个平行,测定粗酶液酶活力。

1.2.4.4 培养基初始pH对菌株产酶的影响。将发酵培养基初始pH分别调到3、4、5、6、7、8、9、10,培养温度为20 °C,其他条件维持不变,每组3个平行,测定粗酶液酶活力。

1.2.4.5 摇床转速对菌株产酶的影响。将摇床转速分别调到100、150、200 r/min,培养基pH 7,其他条件维持不变,每组3个平行,测定粗酶液酶活力。

1.2.4.6 发酵时间对菌株产酶的影响。分别选择0、8、16、24、32、40 h为发酵培养时间,转速100 r/min,其他条件维持不变,每组3个平行,测定粗酶液酶活力^[10-11]。

1.2.5 酶学性质研究。

1.2.5.1 酶反应最适pH测定。将酶液与不同pH缓冲液配制的一系列底物在40 °C保温,通过测定酶活力,得到酶反应的最适pH及pH对酶活力的影响。

1.2.5.2 酶pH的稳定性测定。将酶液置于pH 3~10的不同缓冲液配制的一系列底物中,于40 °C保温60 min,测定剩余酶活力。

1.2.5.3 酶反应的最适温度测定。在20~90 °C内,以10 °C为间隔,在不同温度条件下将酶液与底物在pH为10的缓冲液中进行酶促反应,测酶活力。

1.2.5.4 酶反应温度的稳定性测定。将酶液在不同温度下保温60 min后测剩余酶活力。相对酶活力以同一指标中最高酶活力为100%^[11-12]。

1.2.6 菌种鉴定。将分离菌株在2216E培养基上培养1 d,采用TaKaRa细菌基因组DNA提取试剂盒对菌株进行基因组DNA提取。根据细菌16S rRNA保守序列,合成PCR扩增引物如下:上游引物F8(5'-GAGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'),下游引物R1492(5'-CGGCTACCTGTACGAC-3')。

反应体系(50 μL):25 μL 2 \times 缓冲液(Mg^{2+} plus),8 μL dNTPs混合物(2.5 $\mu\text{mol/L}$),1 μL 引物F8和R1492(20 $\mu\text{mol/L}$),2 μL 模板DNA,0.5 μL LA Taq DNA聚合酶(5 U/ μL)和13.5 μL 的无菌水。

PCR反应条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 2 min,共30个循环;72 °C 5 min。16S rDNA基因扩增产物经PCR产物纯化试剂盒纯化后进行测序分析。测序结果与NCBI的GenBank进行BLAST分析,选取相似度相近及层次差异序列进行分析,并选用*Escherichia coli* strain ATCC35469(KP941759) 16S rDNA序列为外群。

2 结果与分析

2.1 产蛋白酶海洋细菌的筛选结果 用平板透明圈法初筛共得到15株能够产蛋白酶的菌株,其中Hc为10的有3株,Hc大于7的有3株,Hc小于5的有3株。取其中Hc较高的菌株进行发酵,测定粗酶液的酶活力,最后选取酶活力最高的PB02进行深入研究。

2.2 菌株鉴定结果 采用序列分析软件MEGA5.05 Alignment程序对整理的序列进行核酸序列比对,进一步使用Phylogeny程序,以Neighbor-Joining Tree法进行系统发育树的构建。

由图1可知,PB02 16S rDNA与交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)物种差异最低,相似度最高,可能为其中的一株未测序或新菌种。

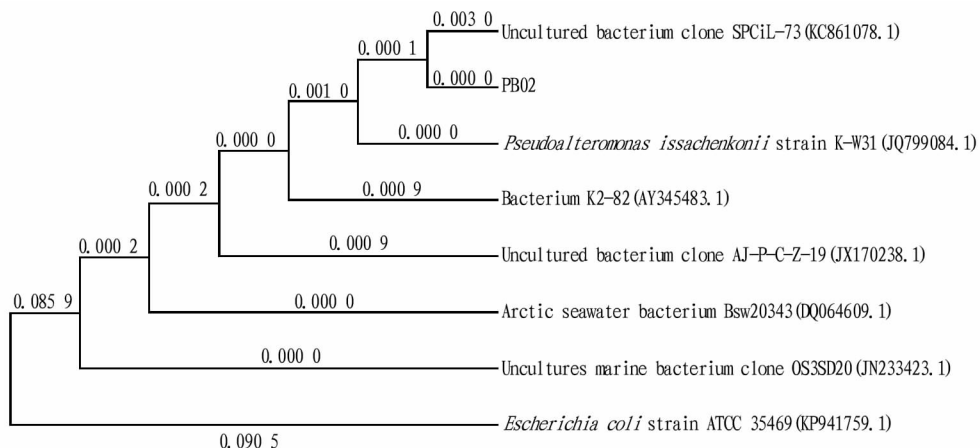


图1 PB02系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of PB02

2.3 发酵条件优化

2.3.1 装液量对菌株产酶活力的影响。由图 2 可知,装液量为 25.0 mL 时,所测得的蛋白酶活力最高;当装液量多于 25.0 mL 时,酶活力开始有逐渐下降的趋势,这可能是由于装液量过高使得培养液的溶氧量降低。所以,以 25.0 mL 的装液量为摇瓶发酵培养的最佳装液量。

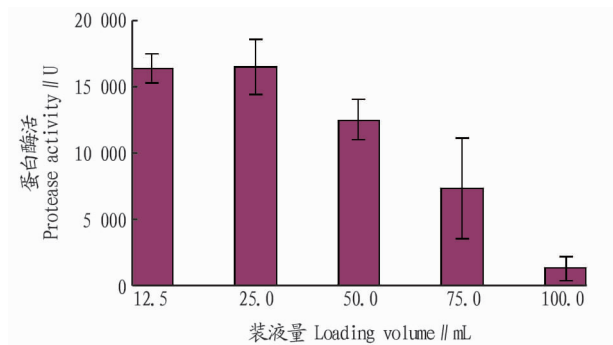


图 2 装液量对菌株产酶活力的影响

Fig. 2 Effects of loading volume on the enzyme activity of the strain

2.3.2 接种量对菌株产酶活力的影响。发酵培养时,较大的接种量可使菌体快速地进入稳定期,但也可以使生长繁殖的时间缩短;较小的接种量可以使对数生长期延长。由图 3 可知,以 0.5% 的接种量为摇瓶发酵培养的最适接种量。

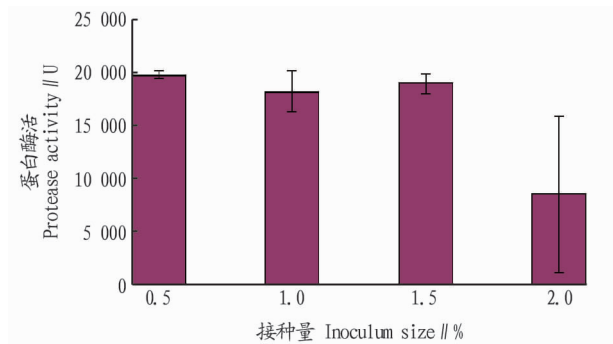


图 3 接种量对菌株产酶活力的影响

Fig. 3 Effects of inoculum size on the enzyme activity of the strain

2.3.3 培养温度对菌株产酶的影响。温度既对菌体生长有一定的影响,也对酶活力有重要的影响。由图 4 可知,当温度为 15~20 °C 时,蛋白酶活力随温度的增加有升高的趋势;当温度高于 20 °C 时,酶活力有下降的趋势;以 20 °C 发酵时,测得的蛋白酶活力最高。所以确定 20 °C 作为发酵培养的最适温度。

2.3.4 培养基初始 pH 对菌株产酶的影响。由图 5 可知,当初始 pH 为 6~7 时,蛋白酶活力随初始 pH 的增大出现升高的趋势;初始 pH 高于 7 时,酶活力有逐渐下降的趋势;初始 pH 为 7 时,测得的蛋白酶活力最高,所以确定 7 作为发酵培养基的初始 pH。

2.3.5 摇床转速对菌株产酶的影响。摇床振荡培养能够使菌体与培养基充分接触,增加溶氧量,满足菌体的生长需求。底物可以更好地在体系内转移和发挥作用,有利于对不同参

数的取样测定。由图 6 可知,以 100 r/min 的转速为摇瓶发酵的最适摇床转速。

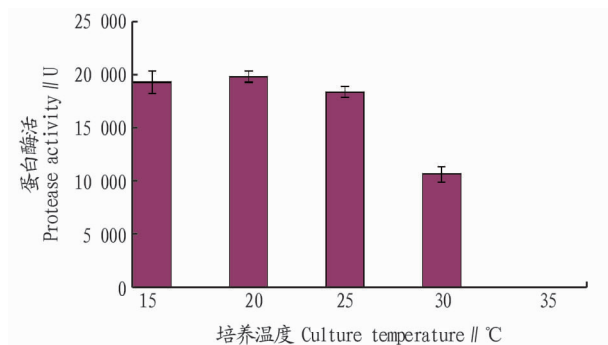


图 4 培养温度对菌株产酶活力的影响

Fig. 4 Effects of culture temperature on the enzyme activity of the strain

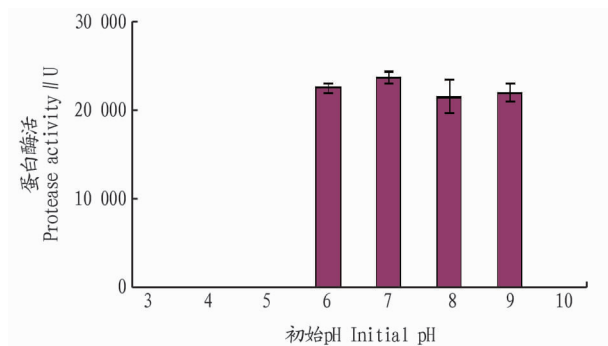


图 5 培养基初始 pH 对菌株产酶活力的影响

Fig. 5 Effects of the initial pH of the medium on the enzyme activity of the strain

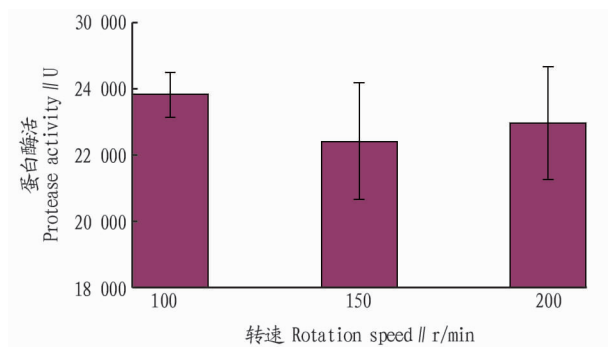


图 6 摇床转速对菌株产酶活力的影响

Fig. 6 Effects of rotation speed on the enzyme activity of the strain

2.3.6 发酵时间对菌株产酶的影响。发酵时间分为两个阶段,一是菌体的生长阶段,二是发酵产酶阶段。由图 7 可知,发酵时间为 0~16 h 时酶活力逐渐提高,说明这时的菌体数不断增加;发酵时间为 16~32 h 时酶活力平缓下降,其中 16 h 时酶活力最高,因此确定发酵时间 16 h 作为发酵培养的最适产酶发酵时间。

2.4 酶活性质研究

2.4.1 酶反应最适 pH 测定。将酶液与不同 pH 缓冲液配制的一系列底物在 40 °C 保温,测得的酶活力结果表明:酶反应的最适 pH 为 10,在 pH 为 7~9 时具有稳定的、较高的酶活

力,能保持最适 pH 时的 70% 以上, pH 为 7、8 时,酶活力为最适 pH 时的 94%,而 pH 为 6 时,酶活力仅为最适 pH 时的 40%,说明 PBO2 产生的为碱性蛋白酶(图 8)。

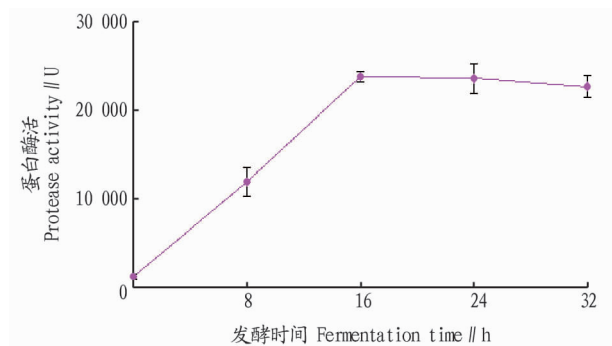


图 7 发酵时间对菌株产酶的影响

Fig. 7 Effects of fermentation time on the enzyme activity of the strain

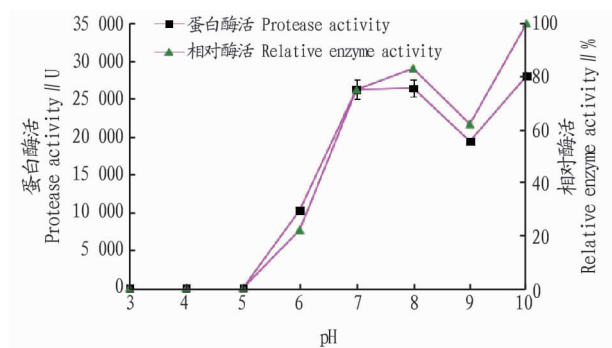


图 8 pH 对蛋白酶活力和稳定性的影响

Fig. 8 Effects of pH on activity and stability of protease

2.4.2 酶的 pH 稳定性测定。将酶液置于不同 pH 环境中保温 60 min,测定剩余酶活力结果表明:该菌产酶在 pH 为 7~10 内,酶活力均可保持在 62% 以上(图 8)。

2.4.3 酶反应最适温度测定。不同温度条件下的酶促反应结果表明:最适反应温度为 40 °C,在 30~60 °C 内具有较高的酶活力,可保持在最适温度时的 79% 以上,而当温度升高至 60 °C 时,酶活力急剧下降至最适温度时的 27%(图 9)。

2.4.4 酶的热稳定性测定。将酶液在不同温度下保温 60 min 后测剩余酶活力,发现温度超过 60 °C 以后,酶活力下降很快,30~60 °C 时酶活保持 84% 以上,而 90 °C 时酶活力下降至 30%(图 9)。

3 结论

此次试验分别从洋沙山和象山海域采集海洋样品进行

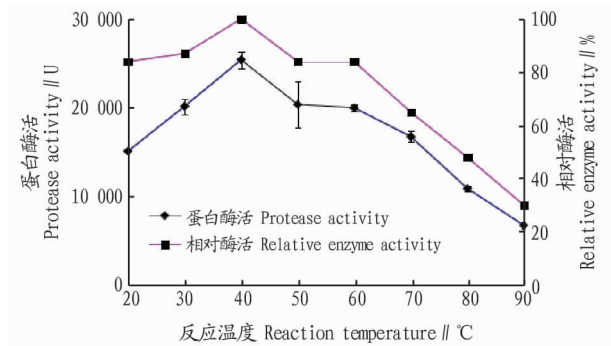


图 9 温度对蛋白酶活力和稳定性的影响

Fig. 9 Effects of temperature on activity and stability of protease

产蛋白酶海洋细菌的筛选,初筛共得到 15 株蛋白酶活性菌株,其中 1 株酶活较高的菌株 PBO2 经 16S rDNA 鉴定为交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)。通过产酶条件优化得出,PBO2 号菌培养的最适 pH 为 7,0.5% 的接种量,10% 的装液量,20 °C 的培养温度,100 r/min 的摇床转速,发酵时间 16 h 最利于产酶。酶学性质研究表明,PBO2 号菌产生的为碱性蛋白酶,酶反应的最适 pH 为 10,蛋白酶在 pH 为 7~9 时具有稳定的酶活力,能保持最适 pH 的 70% 以上。PBO2 号菌株不耐高温,酶反应的最适温度为 40 °C。该研究为今后对产蛋白酶海洋活性菌株的深入研究奠定了基础。

参考文献

- 胡学智,王俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. 工业微生物,2008,38(4): 49-61.
- 路英华. 蛋白酶的研究进展[J]. 生命科学信息,1991,8(2): 8-10.
- NASCIMENTO W C A, MARTINS M L L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp[J]. Brazilian journal of microbiology, 2004, 35: 91-96.
- RAI S K, ROY J K, MUKHERJEE A K. Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezuensis* sp. nov. AS-S24-II[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 85(5): 1437-1450.
- 张晓. 海洋产蛋白酶菌的分离、培养及其防污活性研究[M]. 青岛:中国海洋大学,2013:12.
- 刘婷,张天斌,林云山. 产中性蛋白酶菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 湖南农业科学,2009(5): 102-104,107.
- 张锐. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件的研究[J]. 微生物学通报,2001,28(4): 5-9.
- 万琦,陆兆新,高宏. 低温碱性蛋白酶菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 微生物学杂志,2002,22(5): 16-18.
- 宋明徽. 产碱性蛋白酶海洋细菌筛选及发酵研究[M]. 大连:大连工业大学,2013:12-14.
- 张力元. 海洋来源产蛋白酶的菌株筛选及其产酶条件的优化研究[M]. 保定:河北农业大学,2009:20-47.
- 方春玉,周健,邓静,等. 沪型大曲霉产酸性蛋白酶条件的优化及其酶学性质的研究[J]. 食品与发酵科技,2011,47(2): 13-19.
- 曲均革,姚晓敏,朱鹏,等. 产纤维素酶海洋细菌的筛选鉴定和产酶条件优化[J]. 上海海洋大学学报,2012,21(6): 1054-1056.
- 胡爽. 重庆市生活污染源产排污系数研究[D]. 重庆:重庆大学,2008.
- 王文林,胡孟春,唐晓燕. 太湖流域农村生活污水产排污系数测算[J]. 生态与农村环境学报,2010,26(6): 616-621.
- 王梦雅,李海华,赵宝帅,等. 河南省畜禽养殖污染调查及时空特征分析研究[J]. 环境科学与管理,2014,39(10): 48-51.
- 宋大平,庄大方,陈巍. 安徽省畜禽粪便污染耕地、水体现状及其风险评估[J]. 环境科学,2012,33(1): 110-116.
- 钟定胜,张宏伟,等. 标污染负荷法评价污染源对水环境的影响[J]. 中国给水排水,2005,21(5): 101-103.

(上接第 61 页)

- 余国忠,苏华,刘向春,等. 信阳市大型水库功能演变对水库水质的影响:以南湾水库为例[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),2009,22(1): 84-87.
- 尤宾. 信阳市南湾水库饮用水水源地现状评价及保护对策研究[J]. 水资源保护,2001(4): 45-47.
- 阮晓红. 非点源污染负荷的水环境影响及其量化方法研究[D]. 南京:河海大学,2002.
- 曹高明,杜强,宫辉力,等. 非点源污染研究综述[J]. 中国水利水电科学研究院学报,2011,9(1): 35-40.